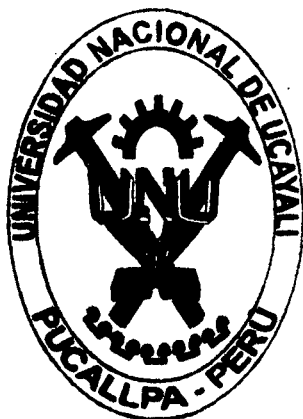


# UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA FORESTAL



---

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BENCILAMINOPURINA Y ACIDO  
INDOLBUTÍRICO EN LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES  
DE *Mankara bidentata* (QUINILLA COLORADA)”**

---

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO FORESTAL**

**AUTOR  
FERNANDO NACIMIENTO PONCE**

**PUCALLPA - PERÚ**

**2014**





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES**



**COMISION DE GRADOS Y TITULOS**

**ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS N° 263**


En la ciudad de Pucallpa a los 23 dias del mes de Mayo del 2014, en la butaca N° 1 de la Universidad Nacional de Ucayali, siendo las 13:25 horas, los miembros del Jurado Evaluador se reunieron, estando conformado por los siguientes docentes:

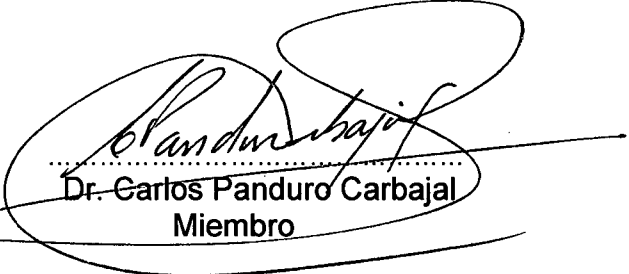
Dr. Carlos Fachin Mattos, Presidente  
Dr. Carlos Panduro Carbajal, Miembro.  
Ing. Clovis Ramírez Ramírez, Miembro.

Para proceder a evaluar la sustentación de tesis titulado: "EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BENCILAMINOPURINA Y ACIDO INDOLBUTÍRICO EN LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES DE *Manilkara bidentata* (QUINILLA COLORADA) Pucallpa-Ucayali, Perú", de la Escuela de Ingeniería Forestal, sustentado por el Bachiller Fernando Nacimiento Ponce.

Terminada la exposición se procedió a la formulación de preguntas por parte de los miembros del Jurado, siendo absuelto satisfactoriamente, lo que permitió al Jurado calificador llegar a la siguiente conclusión: APROBADO POR UNANIMIDAD, quedando el tesista expedito para obtener el Título de Ingeniero Forestal, con los arreglos que el jurado crea conveniente para la publicación.

Siendo las 14:17 horas se dio por concluido el acto académico.

  
.....  
Dr. Carlos Fachin Mattos  
Presidente

  
.....  
Dr. Carlos Panduro Carbajal  
Miembro

  
.....  
Ing. Clovis Ramírez Ramírez  
Miembro.

## DEDICATORIA

En primer lugar a Dios, creador de los cielos, la tierra y de todo cuanto existe, porque con su gran poder y bondad me brindó salud y sabiduría para poder realizar y culminar este trabajo, solo a Él sea la gloria y honra.

A mis queridos padres, Fernando y Emelda por su amor y gran cariño incondicional, que me dieron el impulso necesario para cumplir mis metas.

A mis hermanos Felipe, Manuel y Esther.

A mis amigos que de alguna u otra manera apoyaron mi formación profesional.

## AGRADECIMIENTO

Al Ing. MSc. Cesar Mori Montero, por todo el apoyo científico y logístico, dándome la oportunidad de desarrollar el presente trabajo de investigación en el marco de los objetivos del presente proyecto, como asesor de tesis me dio sus importantes recomendaciones.

Al Ing. Pablo P. Villegas Panduro, mi coasesor en el presente trabajo, con su experiencia y amplio conocimiento sobre el tema, me guio, siendo imprescindible la ayuda que me proporcionó para realizar todas las fases de la investigación.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron directa o indirectamente al desarrollo del presente trabajo de tesis.

INDICE GENERAL	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE FOTOS.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMARY.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
1. Planteamiento del problema.....	3
1.1 Formulación del problema.....	3
CAPITULO II .....	4
2. MARCO TEORICO.....	4
2.1 Antecedentes de la investigación.....	4
2.2 Generalidades sobre la especie.....	4
2.3 Sistemas de propagación.....	8
2.4 Micropropagación.....	10
2.5 Medio de cultivo.....	12
2.6 Características ideales de una especie en la propagación vegetativa.....	15
2.7 Reguladores de crecimiento.....	15
2.7.1 Las auxinas.....	16
2.7.2 Las citoquininas.....	17
DEFINICIÓN DE TERMINOS BÁSICOS.....	19

CAPITULO III.....	23
METODOLOGÍA.....	23
3.1 Ubicación del área de estudio.....	23
3.2 Material vegetativo.....	23
3.3 Población y muestra.....	23
3.4 Materiales.....	24
3.4.1 Material biológico.....	24
3.4.2 Materiales de laboratorio.....	24
3.4.3 Implementos del operario.....	25
3.4.4 Materiales de escritorio.....	25
3.5 Reconocimiento de las instalaciones del laboratorio.....	26
3.6 Descripción del procedimiento.....	28
3.6.1 Recolección del material vegetativo.....	28
3.6.2 Desinfección de los explantes.....	29
3.6.3 Esterilización de materiales e instrumentos.....	29
3.6.4 Preparación del medio de cultivo MS ½ con la adición de citoquinina6-BAP.....	33
3.6.5 Establecimiento de los explantes en el medio de cultivo MS½ con diversas concentraciones de 6-BAP.....	34
3.7. Procedimiento experimental del tercer ensayo.....	35
3.7.1 Descripción del experimento.....	35
3.7.2 Descripción de los factores y tratamientos en estudio.....	37
3.7.3 Diseño experimental.....	39
3.8 Principales variables evaluadas.....	40
3.8.1 Variables independientes.....	40
3.8.2 Variables dependientes.....	41
3.8.3 Esquema de análisis de varianza (ANVA).....	42

CAPITULO IV.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
4.1. Periodo del experimento.....	43
4.2. Influencia de la dosis de BAP en la formación de brotes (tercer ensayo).....	43
4.3. Influencia de la dosis de AIB en el porcentaje de enraizamiento (%)(Tercer ensayo) .....	44
4.4. Influencia del método de desinfección en la sobrevivencia de explantes.....	44
4.5. Porcentaje de sobrevivencia (%).....	44
4.6. Análisis de varianza.....	45
CAPITULO V.....	46
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
5.1. Conclusiones.....	46
5.2. Recomendaciones.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48
ANEXOS.....	53
LISTA DE CUADROS	
Cuadro 1: Componentes del medio de cultivo MS ½.....	13
Cuadro 2: Segmentos no contaminados (fase con la hormona BAP).....	36
Cuadro 3: Segmentos no contaminados (fase con la hormona AIB).....	37
Cuadro 4: Descripción de los tratamientos empleados con la hormona BAP.....	38
Cuadro 5: Descripción de los tratamientos empleados con la hormona AIB.....	38
Cuadro 6: Esquema de ANVA para la fase BAP.....	42
Cuadro 7: Esquema de ANVA para la fase AIB.....	42
Cuadro 8: Duración y porcentaje de sobrevivencia de explantes.....	43



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Descripción preparación del medio de cultivo.....	34
Figura 2: Diagrama del diseño experimental en la fase con BAP.....	39
Figura 3: Diagrama del diseño experimental en la fase con AIB.....	40

## LISTA DE FOTOS

Foto 1: Hojas jóvenes de quinilla.....	5
Foto 2: Hojas adultas de quinilla.....	6
Foto 3: Látex exudado de la quinilla.....	6
Foto 4: Plantación de quinilla.....	6
Foto 5: Autoclave vertical 1.....	26
Foto 6: Autoclave vertical 2.....	26
Foto 7: Cámara de flujo laminar.....	27
Foto 8: Parte de la rama del cual se obtiene el segmento nodal.....	28
Foto 9: Segmento nodal de 1 cm obtenido de la rama joven.....	28
Foto 10: Placa petri lista para esterilizar en la estufa.....	29
Foto 11: Esterilización de los frascos en el autoclave.....	31
Foto 12: Desinfección de la cámara de siembra.....	31
Foto 13: Esterilización del instrumento metálico.....	32
Foto 14: Siembra del explante.....	33

## LISTA DE ANEXOS

Foto 15: Desinfección de la cámara de siembra.....	53
Foto 16: Frascos rotulados y listos para evaluar.....	53
Foto 17: Frascos en la cámara de incubación.....	53
Foto 18: Evaluación de los explantes.....	53
Foto 19: Explantes resecados y contaminados.....	54
Foto 20: Explantes contaminados con bacterias.....	54

Foto 21: Resiembra de los explantes no contaminados.....	54
Foto 22: Evaluación de los explantes con el antibiótico.....	54
Foto 23: Frutos de quinilla colorada.....	55
Foto 24: Semillas de quinilla colorada.....	55

## RESUMEN

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas de la Universidad Nacional de Ucayali, Pucallpa-Perú. Se seleccionó plantas jóvenes de la especie *Manilkara bidentata* (quinilla colorada), luego en el laboratorio se realizó el protocolo de desinfección pertinente y se instaló los segmentos nodales obtenidas de dichas plantas en los tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo con las respectivas dosis de la primera hormona (6-BAP), seguidamente fueron distribuidas aleatoriamente en la cámara de incubación para su evaluación.

El objetivo fue determinar el efecto de cuatro dosis hormonales de crecimiento, primero bencilaminopurina (6-BAP) en la producción de brotes y segundo, el mismo número de dosis de ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento de los segmentos nodales en ambiente controlado. Se realizaron dos ensayos consecutivos, en los cuales no se obtuvieron resultados esperados, realizado bajo las mismas condiciones ambientales; después se realizó un tercer ensayo modificando algo del procedimiento inicial, disminuyendo el tiempo de desinfección y agregándole al medio de cultivo una dosis del antibiótico (tetraciclina), obteniéndose una considerable reducción en la tasa de marchitamiento y contaminación por hongos y bacterias hacia el material vegetativo; se esperaba con este avance, que alguna dosis hormonal diera el resultado deseado en los explantes, sin embargo no fue así hasta el final del experimento, indicando que la "quinilla colorada" es una especie que aún ofrece un alto grado de dificultad para obtener buenos resultados mediante esta técnica, debido mayormente al poco conocimiento de los parámetros cuantitativos precisos, lo cual seguirá siendo motivo de investigación para futuros experimentos.

## SUMMARY

The experiment was conducted at the Laboratory of Tissue Culture and meristems of the National University of Ucayali, Pucallpa, Peru. Young plants of the species *Manilkara bidentata* (red quinilla) was selected, then in the lab protocol appropriate disinfection was performed and nodal segments obtained from such plants in the test tubes containing culture medium with the respective doses was installed the first hormone (6-BAP), then were randomized in the incubation chamber for evaluation.

The objective was to determine the effect of four doses of growth hormone, first benzylaminopurine (6-BAP) on shoot production and second, the same number of doses of indole butyric acid (IBA) on the rooting of nodal segments in a controlled environment. Two consecutive trials were conducted in which results were not expected, they performed under the same environmental conditions; then a third test modifying some of the initial procedure, decreasing the disinfecting time and adding to the culture medium a dose of antibiotic (tetracycline), resulting in a considerable reduction in the rate of wilt and fungal contamination and bacteria into the plant material is performed ;expected with this progress, which some hormonal doses give the desired explants result, however it was not until the end of the experiment, indicating that the "red quinilla" is a species that still offers a high degree of difficulty in obtaining good results with this technique, largely due to poor knowledge of the precise quantitative parameters, which will remain under investigation for future experiments.

## INTRODUCCIÓN

Es innegable que desde hace varias décadas los bosques amazónicos vienen sufriendo la deforestación de sus recursos de manera tal, que la palabra "irracional", ya está quedando corta, esto se evidencia en la desaparición de miles de hectáreas de bosques amazónicos al año, causadas principalmente debido a la tala ilegal, la agricultura migratoria y la minería ilegal, cuyo aprovechamiento irracional está afectando directamente la capacidad de regeneración natural, trayendo como consecuencia la desaparición de diversas especies forestales, causando graves daños a los ecosistemas y al medioambiente en general.

Por otro lado, debido a ello en otros sectores se está generando una preocupación y creando conciencia que conlleva a tratar de mitigar los daños causados, proponiendo mecanismos, que puedan proporcionar la producción y al mismo tiempo la preservación de los recursos del bosque, como valiosas especies forestales maderables que hagan posible mantener el ecosistema en equilibrio y además, permita su utilización racional ya que también estas especies representan un alto valor comercial para la industria forestal.

Dentro de estos mecanismos está el método de propagación *in vitro* que es una biotecnología en laboratorio que aplica el cultivo de tejidos vegetales (segmentos nodales), el cual busca obtener poblaciones idénticas con características deseables, en el menor tiempo posible (de tres a seis meses), controladas mediante la adición de sustancias, principalmente, reguladores de crecimiento (hormonas), al medio de cultivo y también variando la concentración de determinados nutrientes. Debido a la versatilidad de este método con especies de difícil propagación y de ciclos largos de vida lo encontramos apropiado para realizar este proceso en una especie maderable que cada vez se torna más escasa por su aprovechamiento irracional, *Manilkara bidentata* (quinilla colorada), que es una especie difícil de propagar y muy valiosa tanto para su ecosistema como para la industria, ya que tiene una amplia demanda en el mercado por sus excelentes propiedades mecánicas y buena resistencia natural. Es por ello que para la presente investigación nos planteamos como:

**Objetivo general:**

Evaluar el efecto de dos hormonas de crecimiento (Bencilaminopurina 6-BAP y Acido Indolbutírico AIB) en la propagación *in Vitro* de segmentos nodales de *Manilkara bidentata* (Quinilla colorada).

**Objetivos específicos:**

- Determinar el efecto de cuatro concentraciones (0,1,3 y 6mg/Lt) de Bencilaminopurina (6-BAP), en la formación de brotes a partir de segmentos nodales de quinilla colorada.
- Determinar el efecto de cuatro concentraciones (0,1,3 y 6mg/Lt) de Ácido Indolbutírico (AIB), en el enraizamiento y desarrollo de los nuevos brotes aislados.

## CAPITULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Formulación del problema:

Esta investigación encuentra como principal problema, el limitado o nulo conocimiento de esta metodología en la propagación *in Vitro* segmentos nodales de quinilla colorada, basándose directamente en el desconocimiento del efecto hormonal de citoquininas y auxinas, así como la concentración en la que se deben de utilizar tales fitorreguladores para favorecer la brotación y el enraizamiento de los segmentos nodales. Tal como indican Hartmann y Kester (1983) en el caso de las auxinas, si es en menor cantidad no favorece el enraizamiento y si es en exceso lo intoxica produciendo la muerte de los tejidos por ende la pudrición de los segmentos nodales. Conocer el nivel permitirá aumentar el porcentaje de enraizamiento, acelerar el tiempo de formación de raíces y mejorar la calidad del sistema radicular formado.

En la actualidad se utilizan con mayor frecuencia métodos convencionales para la propagación de especies forestales con valor comercial. Todos estos métodos se basan en el manejo en campo desde la germinación continuando con las sucesivas etapas de la vida de los árboles, dando como resultado que cada semilla da origen a individuos con diferente carga genotípica, es decir diferentes entre sí. Por otra parte los métodos convencionales de propagación sexual de las especies forestales, frecuentemente presentan inconvenientes de falta de uniformidad genética y disponibilidad de cantidades de semilla adecuadas para establecer una plantación comercial de calidad. (Guevara, 1996/cit. por Orellana, 1997).

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedente de la investigación

Valdivia Marquez (2010) realizó una investigación al respecto, con el principal propósito de evaluar cuatro concentraciones de citoquinina 6-BAP (0.0; 0.1; 0.2 y 0.5 mg/l), en la formación de brotes a partir de segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* G. King (caoba), obteniendo con la concentración 0.5 mg/l de su experimento "A", un 3.33 % de formación de brotes, siendo esta la única concentración que presentó resultados favorables a la formación de brotes en su experimento.

#### 2.2. Generalidades sobre la especie en estudio

##### 2.2.1. Distribución y hábitat

La quinilla es una especie nativa de Puerto Rico, con una distribución extensa a través de las Indias Occidentales y desde México a través de Panamá hasta el norte de la América del Sur, incluyendo las Guyanas y Venezuela, hasta Perú y el norte de Brasil (Richter y Dallwitz. 2009).

La quinilla se encuentra desde cerca del nivel del mar hasta una altitud de 600m. El árbol es una especie primaria y es altamente tolerante de la sombra. La quinilla es una especie nativa de los suelos arcillosos-ácidos, derivados *in situ* o depositados por los procesos aluviales o coluviales. Los censos en existencia indican que crece principalmente en los suelos de los órdenes inceptisoles y oxisoles. La quinilla prospera en una variedad de suelos que van desde arcillas hasta arenas, incluyendo los suelos rocosos, y en varias formaciones geológicas diferentes. Fisiográficamente, se le encuentra en pendientes y llanos y en valles abiertos, (Richter y Dallwitz. 2009).



### 2.2.2. Descripción morfológica

La quinilla llega a alcanzar de 25 a 40 m de altura; la forma del tronco es circular; y se encuentran trozas de buena calidad de 15 a 25 m de longitud y de 50 a 85 cm de diámetro; los aletones son de variado desarrollo, que van de poco desarrollados hasta bien desarrollados, altos y extendidos. Con copa estratificada de color verde oscuro a verde claro. La corteza superficial del tronco es grisácea, con apariencia áspera, fisuras profundas; con una corteza muerta gruesa; y la corteza viva es de color rojo anaranjado. Tiene un látex blanco, abundante y pegajoso. (Richter y Dallwitz, 2009). La Corteza externa, es de color marrón, algunas veces de apariencia rojiza, con ritidoma en placas. La Corteza interna, tiene una apariencia de color rosado a rojiza, más oscura en troncos adultos, exuda látex blanco.

Las hojas, son simples, alternas y agrupadas en las ramas terminales con crecimiento rítmico; la Yema terminal prominente, obovadas, glabras y cartáceas; con peciolo acanalado dispuestos en espiral en la rama terminal.

Las flores, son blancas y perfectas aparecen anualmente en un pedúnculo al comienzo de la temporada lluviosa, principalmente desde mayo hasta el final de agosto, con una florescencia ocasional al final del otoño. Las frutas se desarrollan a través del otoño, con la caída principal de la fruta ocurriendo en el invierno y al inicio de la primavera. Los frutos del *Manilkara* consisten de bayas globosas de alrededor de 2.5 cm de diámetro y por lo usual contienen una sola semilla negra y brillante, rodeada de una pulpa dulce y gomosa que es comestible. Ocasionalmente se pueden encontrar hasta dos semillas por fruta. (Richter y Dallwitz, 2009).



Foto1: Hojas jóvenes de quinilla

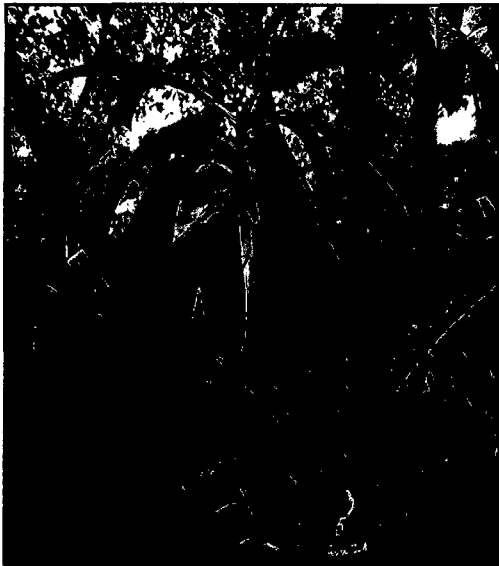


Foto 02: Hojas adultas de quinilla



Foto 3: Látex exudado de quinilla



Foto4: Plantación de quinilla

### 2.2.3. Clasificación botánica

La quinilla se clasifica de la siguiente manera según (USDA, 2010):

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Ebenales
Familia:	Sapotaceae
Género:	Manilkara
Especie:	<i>Manilkara bidentata</i>

La especie *Manilkara bidentata* es conocida de acuerdo al lugar con los nombres de “quinilla”, “balata”, “pamashto”

### 2.2.4. Usos

La madera es utilizada para pisos, postes, chapas decorativas, instrumentos musicales y construcciones pesadas. Algunas veces para extraer látex. El duramen es de un color rojo claro cuando recién cortado y se vuelve pardo rojizo cuando seco. La albura es de blanquecina a parda clara. La madera es muy dura, fuerte, de textura fina y pesada. La madera se clasifica como excelente para el taladrado, moderada para el cepillado y pobre para el torneado. Es difícil de secar al aire y muestra un cuarteamiento y torcimiento severos si se seca con demasiada rapidez. (Richter y Dallwitz 2009).

La madera se acaba muy bien y se asemeja a la caoba. Es muy resistente a la termita de la madera seca, *Cryptotermes brevis*, altamente resistente a las termitas subterráneas, *Coptotermes niger*, *Heterotermes convexinotatus*, *H. tennis* y *Nasutitermes corniger*, pero susceptible a la polilla de mar. La madera es también muy resistente a los hongos de la pudrición blanca y parda, y es muy durable en contacto con el suelo. (Richter y Dallwitz 2009).

Sus excelentes propiedades para ser doblada a vapor la hacen adecuada para la armazón de botes y otros tipos de trabajo con madera doblada. En algunas áreas, los árboles han rendido látex por más de 25 años. El látex se coagula con el calor del fuego o se seca al sol, para después usarse para fabricar recuerdos turísticos o artículos novedosos. La savia de algunas de las especies de este género aparentemente puede ser usada como un sustituto para la leche de vaca. El látex tiene la consistencia y sabor de la crema, pero el consumo excesivo de la misma puede resultar en una severa constipación.

### **2.3. Sistemas de propagación.**

La propagación de las plantas se lleva a cabo mediante dos formas fundamentales: la reproducción sexual y la multiplicación vía asexual o vegetativa, que presentan diversas modalidades de acuerdo a la aptitud y morfología de cada especie (Rocha, 1998).

#### **2.3.1. Propagación sexual.**

La propagación sexual o germinativa, se refiere a la propagación por medio de semillas, en la cual existe una recombinación genética de los progenitores, logrando así la posibilidad de una variabilidad entre las nuevas plantas (Hartmann y Kester, 1996).

#### **2.3.2. Propagación asexual o vegetativa.**

Quijada (1980) dice que la propagación vegetativa, es la obtención de nuevos individuos a partir de partes vegetativas bien diferenciadas, debido a la capacidad de regeneración que posean estas partes (rama, fuste, retoño, hijuelos, inclusive trocitos o tejidos celulares) cuando se colocan en condiciones favorables. Coincidiendo con Vekhov (1941).

Toda la progenie de una planta reproducida asexualmente es genéticamente igual y constituye un clon. Todas las plantas que forman un clon son genéticamente iguales entre sí y con la planta madre, esto es posible porque cada célula que compone la planta contiene la información genética necesaria para generar otro individuo de similares características al del original denominado clon (Sevilla y

Holle, 2004); es probable que en algunos casos no se aprecien las características fenotípicas del individuo original debido a que el nuevo individuo puede ser influenciado por la variación ambiental, pero si es claro que el nuevo individuo es genotípicamente idéntico al original.

Una de las características más significativas de la clonación se refiere a que todos los descendientes del clon tienen el mismo genotipo básico, por lo cual la población tiende a ser fenotípicamente muy uniforme. Por lo general, toda la progenie de un clon tiene el mismo aspecto, tamaño, época de floración, época de maduración, etc., haciendo con ello posible la estandarización de la producción y otros usos del cultivar (Hartmann y Kester, 1996).

Para Zobel y Talbert (1988), la propagación vegetativa tiene ventajas desde el punto de vista investigativo, como lo son:

- a. La valoración genética del material vegetal, incluyendo estudios de interacción genotipo – ambiente.
- b. Determinación de la magnitud y control de los efectos ambientales comunes o efectos que prevalecen en algunas especies.
- c. Preservación de genotipos y complejos genéticos en bancos clonales y jardines de multiplicación para fines específicos.
- d. Reducción del ciclo reproductivo para acelerar los procesos y prueba de cruzamiento.

### **2.3.3. Importancia de la propagación vegetativa**

Este tipo de reproducción en el campo forestal se usa para multiplicar árboles seleccionados con base a características deseables que se quieren perpetuar como: velocidad de crecimiento, rectitud del fuste, resistencia a plagas y enfermedades, es decir, permite conservar genotipos valiosos (Carrera 1977).

#### **2.3.4. Métodos de propagación vegetativa.**

Hartmann y Kester (1983) dicen que las técnicas de propagación son: Embriones apomícticos, estolones, hijuelos, acodado, separación, división, estaca, injerto, micropropagación.

#### **2.4. Micropropagación.**

La Micropropagación es una biotecnología que se aplica a especies vegetales con el fin de obtener una población en el menor período de tiempo posible. SICA (1998), la define como una biotecnología de «respuesta rápida», puesto que se logran resultados en períodos de 3 a 6 meses, en contraposición con otras biotecnologías en las que el tiempo de investigación es mayor, (Ingeniería genética). Se puede decir, que es además versátil puesto que se adapta a los requerimientos de cada especie en estudio, al aprovechar al máximo la totipotencia celular, para canalizarla hacia la propagación.

#### **Las principales ventajas de la micropropagación:**

Mencionados por Calzada (1980), son: Plantaciones uniformes genéticamente, conservación de la variedad de plantas que se propaga, precocidad para las cosechas, el mejoramiento genético rápido y eficaz, multiplicación de plantas en un espacio y tiempo limitado, menor costo, mayor rapidez y sencillez en la obtención de plantas.

#### **2.4.1 Fases de la micropropagación:**

FASE 0: Preparación de la planta madre. Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. (Closas *et al.* 1999). Esta fase tiene como objetivo asegurar mediante un buen control fitosanitario, las plantas sanas en crecimiento activo y vigoroso para la obtención de explantes sanos a iniciar. (Álvarez. 2006).

FASE I: incluye la selección y aplicación de un esquema de desinfección y la inoculación de los explantes en un medio de iniciación con el objetivo de lograr una elevada tasa de supervivencia y la respuesta deseada. (ÁLVAREZ. 2006). Antes de extraer los explantes se hace una desinfección de los fragmentos de

planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. (Closas *et al.* 1999).

FASE II: Multiplicación de brotes. Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la FASE I originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben sub cultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar. (Closas *et al.* 1999).

FASE III: Enraizamiento. Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser más flexible a la hora de escoger los brotes, ya que éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis. (FFC, 2008).

FASE IV: Aclimatación. Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación (Closas *et al.* 1999). Las plántulas están poco adaptadas a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante.

#### **2.4.2 Métodos de desinfección de explantes**

Collado (2004) establece que los explantes se sumergen en alcohol de 70° por 60 segundos, siguiendo con la introducción de los explantes en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3.0 %, por 30 minutos.

Villalobos (1992) en el cultivo del lirio (*Eucharis amazónica*) con el uso de NaClO al 3.0 % y un tiempo de exposición de 20 minutos obtuvo resultados satisfactorios.

Rodríguez *et al.* (2003) describen bajos índices de contaminación en el establecimiento de ápices de *Cedrela odorata* y *Swietenia mahagoni* con NaClO al 2% y 20 minutos de inmersión de los explantes.

Alvarado-Capó (1998) El tratamiento (NaClO al 1.5 %) con un tiempo de exposición de los explantes durante 10 minutos alcanzó el valor máximo de supervivencia y un bajo porcentaje de contaminación de los segmentos nodales de *Cedrela odorata* L.

## **2.5. Medio de cultivo.**

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos y vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento ocasionalmente con otras sustancias varias. Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir *in vitro*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones.

El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. El medio B5 o de Gamborget *et al.* (1968), o sus varios derivados, ha sido de un gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas. La diferencia principal entre los medios MS y B5 es la menor concentración de nitratos en B5. El medio WPM (1980) de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas. (Pelacho, A. *et al.* 2006).



Sica, A (1998) menciona que el medio de cultivo MS 1/2, está constituido por los componentes del medio MS, con la reducción de los nitratos a la mitad de su concentración tal como se detalla en cuadro siguiente:

Cuadro N°1: Componentes del medio MS ½

Componentes		gr/l
Macronutrientes (10X)	KNO <sub>3</sub>	9,50
	Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	8,25
	Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	4,40
	Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	3,70
	Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,78
Fe - EDTA (100 X)	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	2,78
	EDTA.Na <sub>2</sub>	3,73
Micronutrientes (1000 X)	Ioduro de potasio (KI)	0,830
	Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6,2
	Sulfato cúprico (CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O)	0,025
	Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O)	22,30
	Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	0,25
	Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	8,60
	Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O)	0,025
Compuestos orgánicos	Myo-inositol	10,00
	Tiamina HCl	0,01
	Ácido nicotínico	0,50
	Piridoxina	0,05
	Glycina	0,20
	Sacarosa	30,00 g/L
	Fitigel	4 g/L
	pH	5.7 - 5.8

Fuente: Murashige y Skoog (1962)

Luego añadir 30 g. de sacarosa y agitar hasta que se disuelva completamente. Devolver la solución preparada al Erlenmeyer, agitar y ajustar el pH para que se encuentre entre 5,7-5,8, añadiendo NaOH 0.1 N o HCl 0.1N al medio, finalmente añadir 4 g. de fitagel, agitar y calentar la solución hasta que el fitagel quede disuelto (Sica, 1998).

### **2.5.1. Factores que influyen en la micropropagación.**

- **La temperatura.**

Según Closas *et al.* (1999), determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *In Vitro* puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28<sup>o</sup>C.

En lo mencionado por Barcelo (2001), la temperatura actúa estimulando, hasta un cierto límite, tanto la respiración como el crecimiento y luego actúa como inhibidor. El papel regulador de la temperatura sobre el crecimiento, se realiza a través de la regulación de reacciones enzimáticas que, directa o indirectamente intervienen en el proceso. El óptimo de temperatura la mayoría de las veces está entre 28 y 32<sup>o</sup>C y por encima de los 35<sup>o</sup>C empieza a causar daño, ya que las diferentes reacciones poseen coeficientes de temperatura ligeramente distintos, un cambio de temperatura puede fomentar una reacción y por el contrario perjudicial a otra (Dieter, 1980).

- **El fotoperiodo.**

Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización, etc.) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado *In Vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperiodo *Ex Vitro* será también el mejor fotoperiodo *In Vitro* (Barcelo, 2001).

- **La intensidad de luz.**

La luz artificial puede emplearse para prolongar el fotoperiodo natural, se ha visto que el efecto estimulador no depende de la intensidad de luz, si no de la luz como tal, es decir basta con la luz de una linterna para estimular a una planta a la producción de flores. Para algunas especies la luz de la luna llena basta para generar estimulación a la producción de brotes (Erston, 1967)

## **2.6. Características ideales de una especie en la propagación vegetativa.**

Recto, sano, sin bifurcaciones, con ramas delgadas, de DAP y altura superior al promedio, con copa pequeña y buena capacidad de auto poda (si aplica), los estándares deben ajustarse a la arquitectura de la especie, algunas características deberían ser absolutas (ej. rectitud, ausencia de bifurcación, sanidad), para otras (DAP, altura, diámetro de ramas y tamaño de copa), no se pueden fijar estándares fijos para la especie, sino que el árbol debe ser comparado con sus vecinos más cercanos (Mesen, 1997).

## **2.7. Reguladores de crecimiento.**

El desarrollo vegetal está influenciado, entre otros factores, por diversas sustancias de síntesis natural conocida como hormonas, y otras sintéticas denominadas reguladores de crecimiento. Para distinguir entre las hormonas vegetales y reguladores del crecimiento, se puede decir, que todas las hormonas regulan el crecimiento, pero no todos los reguladores de crecimiento son hormonas; de las fitohormonas (etileno, giberelinas, citoquininas, auxinas e inhibidores del crecimiento, como el ácido abscísico), las auxinas son los que tienen el mayor efecto en cuanto a la división celular y la elongación, así como en un aumento en el transporte de carbohidratos y factores foliares a la base de la estaca, donde se llega a promover el desarrollo y formación del primordio inicial. (Haissig, 1974 cit. Núñez, 1997).

### 2.7.1. Las auxinas.

Las auxinas son sustancias naturales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Afectan al crecimiento del tallo, las hojas, las raíces y al desarrollo de ramas laterales y frutos. La manera en que las auxinas hacen crecer a la planta es por medio del aumento del volumen celular provocado por absorción de agua. (Lucas, 2002)

El mismo autor indica que las auxinas son un grupo de reguladores del desarrollo vegetal relacionado con la elongación celular, dominancia apical, iniciación de raíces, etc. Algunas de las auxinas usadas frecuentemente en cultivos *In Vitro* son: Ácido Indol-acético (AIA), Ácido Naftalen-acético (ANA), Ácido Indolbutírico (IBA) y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Las auxinas son hormonas reguladoras del crecimiento vegetal y, en dosis muy pequeñas, regulan los procesos fisiológicos de las plantas. Las hay de origen natural, como el ácido Indol-acético (AIA), y sintéticas, como el ácido Indolbutírico (AIB) y el ácido Naftalen-acético (ANA). Todas estimulan la formación y el desarrollo de las raíces.

Generalmente las auxinas más utilizadas en la fase de enraizamiento, a nivel *in vitro*, son el ANA, AIB, AIA y 2-4, D; con una eficiencia del 55, 29, 11 y 3.6% en los medios de cultivo, respectivamente, sin embargo el ANA es eficiente para plantas herbáceas, mientras que el AIB es la principal promotora de raíces en plantas leñosas. (Taiz y Zeiger, 1998; Vásquez *et al.*, 2006)

El AIB es probablemente el mejor regulador de crecimiento para uso general debido a que no es tóxico para las plantas en una amplia gama de concentraciones. (Hartmann y Kester, 1997).

Las auxinas se sintetizan en las hojas y meristemos apicales, a partir del aminoácido triptófano y se mueven a través de células parenquimáticas, desde su lugar de formación hacia los haces vasculares del tallo y; a diferencia de lo que ocurre con los azúcares, iones y otros solutos, que se transportan a través de los tubos cribosos del floema; este transporte, célula a célula, se caracteriza

por ser más lento 1cm/hora en raíces y tallos; además es un transporte polar, es decir, siempre basipétalo en el tallo (hacia la base) y en las raíces también es un transporte polar, pero en sentido acropétalo (hacia los ápices). (Strasburger, 1994).

Para el crecimiento de raíces, en general se requieren bajas concentraciones auxínicas (dependiendo de la especie y la edad de la planta), debido a que las células de los meristemos radicales contienen un nivel de auxinas, provenientes de la parte aérea, suficientes para una elongación normal; no así para la formación de raíces adventicias, en donde se requieren mayores concentraciones (Salisbury y Ross, 2000).

El ácido Indol – 3 - Butírico (AIB), es una auxina sintética químicamente similar al Acido Indolacético (AIA) que en la mayoría de las especies ha demostrado su efectividad frente a otras auxinas como el ácido naftalenacético (ANA); la hormona AIB, ofrece muchas ventajas, el cual no se degrada fácilmente por la luz o microorganismos, es insoluble en agua, no es tóxico y permanece por más tiempo en el sitio de aplicación (Mesén, 1997).

Los reguladores vegetales son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de cualquier otro modo cualquier proceso fisiológico de las plantas y la más importante es la auxina. Además, refiere que las máximas concentraciones de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento, es decir, en las yemas y en los ápices en crecimiento de las hojas y raíces, también distribuidos ampliamente por la planta en las regiones meristemáticas (Delvin, 1980).

### **2.7.2. Las Citoquininas.**

Las citoquininas fueron descubiertas en la década de 1950 como factores que promueven la proliferación celular y mantienen el crecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Poco después de su descubrimiento Skoog y Miller propusieron que la formación de órganos en las plantas se debe al balance existente entre las

citoquininas y las auxinas. Usando cultivos de tabaco, demostraron que un balance alto de auxinas favorecía la formación de raíces mientras que un balance alto de citoquininas favorecía la formación de tallos. Las citoquininas también intervienen en la apertura de estomas, supresión de la dominancia apical e inhibición de la senescencia de las hojas entre otros procesos (Azcon, 1993)

Se sintetizan en las puntas de las raíces (en general regiones meristemáticas) y desde allí se desplazan por el xilema hacia las hojas, donde desempeñan importantes funciones en el metabolismo y envejecimiento de las plantas (Weaver, 1976).

Las citoquininas naturales de mayor importancia son la cinetina, zeatina y ribozeatina. Por otro lado, dentro de las citoquininas sintéticas se encuentran la BA o BAP (6- Bencilaminopurina) y el PBA (6- bencilamino-9 (2 tetrahidropiranyl-9H-purina) (Seiler, 2002).

- **Bencilaminopurina (BAP).**

Sus principales funciones dentro de la planta son: estimular la división celular y el crecimiento, romper la latencia de las yemas axilares, promover la organogénesis en los callos celulares, retrasar la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales, promover la expansión celular en cotiledones y hojas, y el desarrollo de los cloroplastos (Seiler, 2002).

## DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- **ANA (Ácido naftalenacético).** Es otra auxina sintética, se usa normalmente para inducir la formación de raíces adventicias en esquejes y para reducir la caída de frutos en algunos cultivos.
- **Ácido Indolbutírico (AIB).** Es una auxina sintética químicamente similar al Ácido Indolacético (AIA) que en la mayoría de las especies ha demostrado ser más efectiva que cualquier otra y es actualmente la de mayor uso como sustancia promotora del enraizamiento (Blazich, 1988).
- **Auxina.** Cualquiera de las hormonas o sustancias activadoras de crecimiento del tallo, raíz, la inhibición de yemas laterales, abscisión de hojas y frutos, desarrollo de frutos y la activación de las células del cambium entre otros procesos. (Hartmann y Kester, 1998).
- **Asimilados.** Cualquier sustancia producida en una planta durante la fotosíntesis.
- **Asexual.** Modalidad de reproducción en la que no tiene lugar la unión de dos células (fecundación) para formar un cigoto con el doble de dotación cromosómica.
- **Árbol Plus.** Árbol con características fenotípicas deseables que ha sido encontrado superior dentro de una población y que es seleccionado para un programa de mejoramiento genético.
- **BA/BAP.** (Benciladenina/Bencilaminopurina). Citoquinina usada generalmente para la inducción de brotes a partir de yemas axilares.
- **Callo.** Es el desarrollo del tejido cicatricial, en la parte del cambium por la rápida división de células parenquimáticas.

- **Citoquinina.** Son sustancias que estimulan la división celular y el crecimiento.
- **Cultivo *In Vitro*.** Técnica basada en la totipotencialidad de las células vegetales y que consiste en cultivar un explante (trozo de vegetal) bajo condiciones de asepsia en un medio químicamente conocido y mantenido en condiciones controladas con el objeto de originar una nueva planta.
- **Estomas.** Las estomas son grupos de dos o más células epidérmicas especializadas cuya función es regular el intercambio gaseoso y la transpiración.
- **Fenotipo.** La característica visible de un árbol. El fenotipo es determinado por la interacción del genotipo con el ambiente en que éste crece.
- **Fotoperiodo.** Duración del tiempo diario en que las plantas u órganos están sometidas a la luz.
- **Gen.** Fragmento de ADN que constituya la más pequeña unidad funcional.
- **Genotipo.** Conjunto de genes que se determinan el fenotipo de los individuos de una especie. Generalmente se refiere a la composición alélica de un gen particular o de una serie de genes.
- **Germoplasma.** La variabilidad genética total, representada por células germinales, disponibles para una población particular de organismos.
- **Hormona.** Cualquier producto químico de naturaleza orgánica que sirve de mensajero químico, ya que producido en una parte de la planta tiene como "blanco" otra parte de ella.
- **Humedad atmosférica.** Es la cantidad de vapor de agua contenida en el aire y varía según las condiciones climatológicas, está presente en la



troposfera (desde el nivel del mar hasta una altura media de 11 Km.) y varía de 0 a 25 % en volumen.

- **Intensidad de luz.** Nivel o cantidad de energía emitida bien por una fuente de luz natural (ejm. el sol) o bien por una artificial.
- **Micropropagación.** Propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo nutritivo adecuado.
- **Medio de cultivo.** Es el material alimenticio artificial preparado en el laboratorio que sirve como fuente de nutrientes, vitaminas y carbohidratos a las plantas cultivadas en condiciones *In Vitro*.
- **Ortet.** La planta madre de donde se obtiene el material vegetativo que se propagara.
- **Ortotropismo.** Es el crecimiento vertical de un brote que no está sujeto a ninguna influencia externa.
- **pH.** Símbolo que representa la concentración relativa de iones hidrógeno en una solución. Los valores del pH oscilan entre 0 y 14. El pH 7 es neutro, menos de 7, ácido y más de 7, alcalino.
- **Plagiotropismo.** Es el crecimiento más o menos horizontal, propio de las ramas laterales bajo dominancia apical.
- **Ramet.** Cada uno de los propágulos vegetativos obtenidos de un ortet. El conjunto de ramets genéticamente idénticos constituyen un clon.
- **Segmentos nodales.** Normalmente incluye la yema lateral y una sección del tallo.

- **Totipotencia.** Capacidad genéticamente retenida que tienen todas las células de dividirse, diferenciarse y dar lugar a un individuo idéntico al que le dio origen.
- **Tuberización.** Transformación de ciertas partes del vegetal en órganos de reserva.
- **Varianza genética.** fuentes genéticas de variación fenotípica entre individuos de una población.

## CAPITULO III

### METODOLOGIA

#### 3.1 Ubicación del área de estudio.

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemos de la Universidad Nacional de Ucayali (UNU), la misma que se encuentra ubicada en el Km. 6.200 de la carretera Federico Basadre, (margen izquierdo), Geográficamente el área está situada a 08° 23' 39.6" de latitud sur y 74° 34' 39.8" de longitud oeste, a 154 m.s.n.m. ciudad de Pucallpa, provincia de Coronel portillo, Región Ucayali, Perú.

#### 3.2 Material vegetativo.

En los ensayos realizados se utilizaron arboles jóvenes de *Manilkara bidentata* (quinilla colorada) de aproximadamente 5 años, producidas a partir de semilla botánica, procedentes del jardín clonal de la estación experimental Macuya ubicado en el km 86 de la Carretera Federico Basadre (Pucallpa-Lima). Las cosechas de las ramas jóvenes se realizaron en tres grupos (uno por ensayo, fueron tres ensayos) durante el periodo de 1 mes entre cada ensayo, correspondiendo al material vegetativo para la obtención de los segmentos nodales de 1 cm. de longitud empleados para cada ensayo.

#### 3.3 Población y muestra.

La población fue la cantidad total de segmentos nodales obtenidas de las ramas jóvenes de las plantas de *Manilkara bidentata* (quinilla colorada) establecidas en el jardín clonal de la Universidad Nacional de Ucayali. La muestra es la cantidad de segmentos nodales utilizadas, 120 para el primer ensayo, 120 para el segundo ensayo y 120 para el tercer ensayo que dieron un total de 360 segmentos nodales.

### **3.4. Materiales**

Los materiales usados fueron los siguientes:

#### **3.4.1. Material biológico**

- Segmentos nodales de *Manilkara bidentata* (quinilla colorada)

#### **3.4.2. Materiales de laboratorio**

##### **A). Material de vidrio**

- 10 Placas petri
- 2 Vasos de precipitado de 1000 ml
- 4 Vasos de precipitado de 250 ml
- 2 Probetas graduadas
- 2 Matraz Erlenmeyer
- 6 Pipetas volumétricas
- 1 Baqueta de vidrio
- Frascos

##### **B). Material de metal**

- 4 Pinzas
- 3 Mangos de bisturí
- Hojas de bisturí
- Tijera.

##### **C). Otros materiales**

- 1 Papel aluminio
- Cinta para medir ph
- 1 Cinta parafina
- Alcohol de 70 y 95 %
- Hipoclorito de sodio
- Tetraciclina 500 mg
- Formate 600 mg
- 1kg hidróxido de cobre

#### **D). Equipos**

- 2 Autoclaves
- 1 Estufa
- 1 Balanza analítica.
- 1 Cocina eléctrica con agitador magnético
- 1 Refrigeradora
- 1 Equipo para fumigar.

#### **E). Reactivos**

- Soluciones de Murashige y Skoog (Solución A, B, C, D, E y V)
- 1 Sacarosa
- 1 Agar
- Tween 80

#### **3.4.3. Implementos del operario**

- Mandil
- Mascarilla

#### **3.4.4. Materiales de escritorio**

- Libreta de notas
- Lapicero
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Calculadora

### 3.5. Reconocimiento de las instalaciones del laboratorio

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas cuenta con las siguientes instalaciones:

#### 3.5.1 Área de preparación:

Esta área es exclusivamente para realizar los trabajos de preparación (desinfección) de los explantes que se empleó, como también la preparación de los medios de cultivos, destilación de agua, el lavado de frascos y otros materiales que se emplearon en el laboratorio.

#### 3.5.2 Área de esterilización:

En esta área se realizó las esterilizaciones de los materiales que se empleó durante el experimento, los equipos que se encuentran en esta área son:

➤ **Dos autoclaves:** Con los cuales se esterilizaron constantemente los materiales que fueron: matraces de Erlenmeyer que contenía agua destilada, frascos y tubos de ensayos que contenían medio de cultivo.

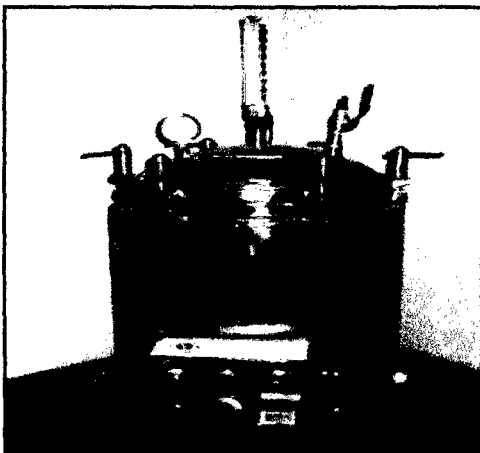


Foto 5: Autoclave vertical 1

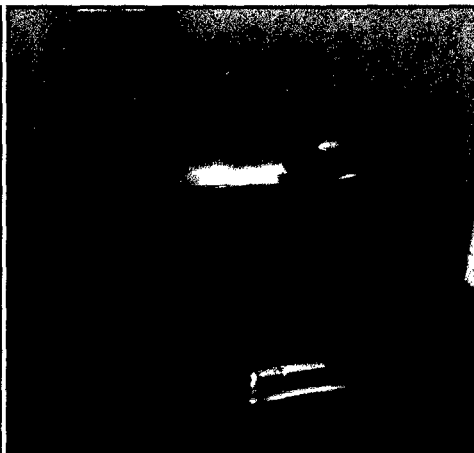


Foto 6: Autoclave vertical 2

➤ **Una Estufa eléctrica de secado:** Aquí se realizó la esterilización de las placas petri y pipeta.

### 3.5.3 Área de siembra o transferencia:

Es el ambiente donde se realizó los cortes, inoculación y transferencia (siembra) de los explantes a los medios de cultivos. En este ambiente se encuentra:

- **Una cámara de siembra o cámara de flujo laminar:** Este equipo presenta una cámara de transferencia que funciona como un filtro que impide el ingreso de microorganismos contaminantes que puede afectar el trabajo realizado. Específicamente en esta cámara se realizaron las siembras de explantes al medio de cultivo correspondiente.

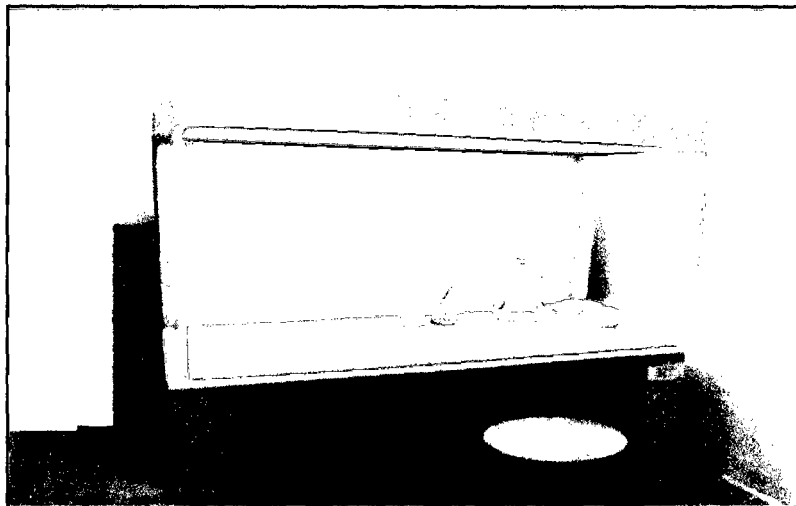


Foto 7. Cámara de flujo laminar.

### 3.5.4 Área de Incubación:

A este ambiente se trasladaron los explantes ya preparados y listos para la formación de brotes. Fue en esta área donde se realizaron los monitoreos y control de las variables ambientales, habitualmente la temperatura, la iluminación y el fotoperiodo.

Normalmente la sala de incubación presentaba las siguientes condiciones:

- Temperatura promedio : 22°C
- Iluminación : 1000 a 5000 lux.
- Humedad Relativa : 70 a 80%

### 3.5.5 Área de almacén:

En este ambiente se encuentran almacenados los reactivos, materiales y equipos que se emplearon para la ejecución del experimento.

### 3.5.6 Área de oficina:

En esta área están ubicados los mobiliarios de oficina como los escritorios, libros de referencia y los equipos de cálculo o computadoras.

## 3.6. Descripción del procedimiento

### 3.6.1 Recolección del material vegetativo.

Fue la fase inicial del ensayo experimental, en la cual se seleccionó al azar los plántones de quinilla colorada de la ubicada en la misma universidad, que previamente se fumigaron con solución fungicida en cuatro ocasiones, por el periodo de un mes para reducir la contaminación por agentes patógenos al momento de realizar los cortes de las ramas juveniles, los mismos que se cortaron con una tijera de podar esterilizada según el protocolo de desinfección, el tamaño promedio de las ramas fue de 20 cm. de longitud que en el laboratorio se seccionó con bisturí en segmentos nodales de un (1) cm de longitud.



Foto 8: parte de la rama del cual se obtiene el segmento nodal.

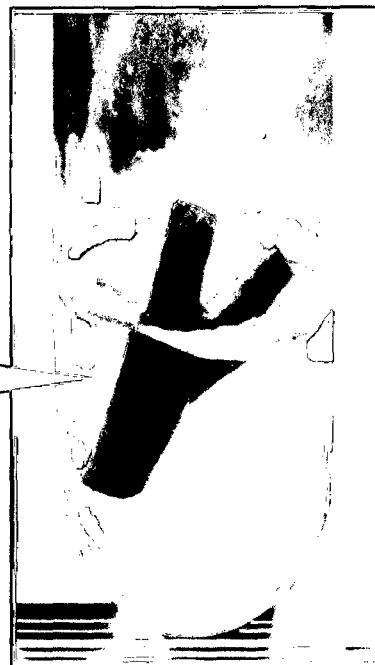


Foto 9: Segmento nodal de 1 cm, obtenido de la rama joven.



### 3.6.2 Desinfección de los explantes:

Para la desinfección de los explantes de quinilla, se procedió de la siguiente manera: los explantes se sumergieron en alcohol de 70° por 60 segundos, inmediatamente después se hizo lo mismo, pero en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3.0 %, por 30 minutos (Collado, 2004), añadiendo dos gotas de Tween 80 como detergente líquido, para mejorar la capacidad desinfectante del hipoclorito de sodio. Para ayudar a la homogenización del medio desinfectante se utilizó un agitador magnético.

Al finalizar el tiempo destinado de inmersión de los explantes en el desinfectante, se enjuagaron tres veces con agua destilada, con el fin de disolver los residuos del hipoclorito que puedan quedar en los explantes. Esto se realizó dentro de la cámara de flujo laminar justo antes del establecimiento en el medio de cultivo, con la finalidad de evitar la exposición de los explantes al medio.

### 3.6.3. Esterilización de materiales e instrumentos

Un requerimiento fundamental para la realización de este experimento fue mantener los cultivos libres de los microorganismos contaminadores lo máximo posible, a continuación se detalla el procedimiento realizado:

**A). Placa petri:** Las placas petri fueron esterilizados en la estufa eléctrica.



Foto 10. Placa petri lista para esterilizar en la estufa.

## **B) Frascos:**

Los frascos que se esterilizaban correspondían a los que contenían los medios de cultivo como también los frascos que eran usados o contaminados, esto con la finalidad de destruir los agentes contaminantes y así evitar que se proliferen en el ambiente (laboratorio). Los pasos para esterilizar frascos fueron los siguientes:

- Se abría la tapa del autoclave y los frascos a esterilizar se acondicionaban en el autoclave, luego se bajaba la tapa y se aseguraba ajustando los pernos.
- Luego se encendía el autoclave hasta observar salir el vapor por la válvula, cuando se observaba este vapor, la válvula se cerraba con la finalidad que haya presión dentro del autoclave, en cuestión de minutos se podía observar por el manómetro que la presión ascendía. Se tenía que observar que la presión llegara a 15 lb para comenzar a controlar 15 minutos (la presión se tenía que mantener de 15 a 20 lb). Una vez completado el tiempo se apagaban los equipos y se dejaba que la presión descendiera a 0 libras para recién poder subir la válvula y abrir la tapa del autoclave.
- Luego se extraían los frascos del autoclave con mucho cuidado.
- Si los frascos contenían los medios de cultivos que iban a ser usados se les llevaba a la sala de siembra, donde ahí eran acondicionados en un ambiente especial para ellos.
- Si los frascos eran usados o estaban contaminados se les realizaba su lavado correspondiente, que consistía en remover todo el residuo contaminado con agua y detergente.



Foto 11. Esterilización de los frascos en el autoclave.

### C).Cámara de flujo laminar:

Para la desinfección de la cámara de flujo laminar se realizaba lo siguiente:

- Se encendía el equipo 30 minutos antes de la siembra.
- Luego se desinfectaba la mesa y las paredes de la cámara con alcohol al 95 %.
- Igualmente se realizaba la desinfección de la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo, el agua estéril, mechero, o cualquier otro objeto que era introducido en la cámara.

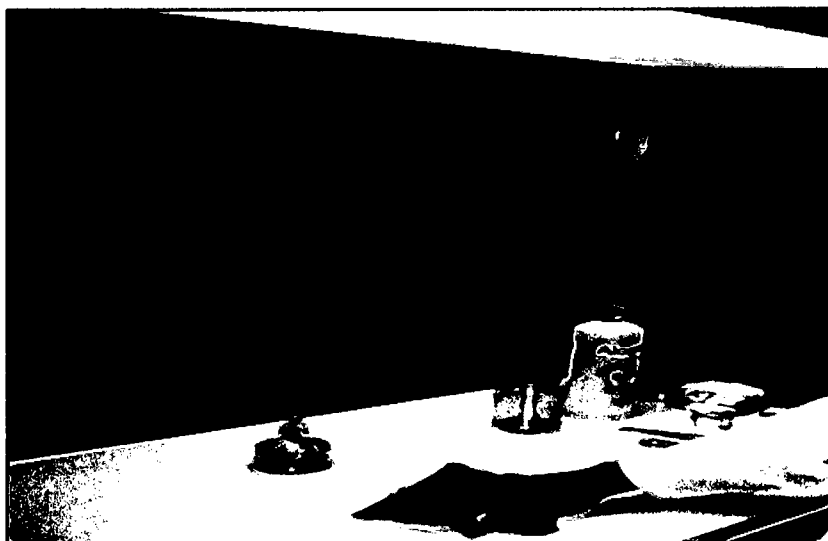


Foto 12. Desinfección de la cámara de siembra

#### D) Bisturí y pinzas (instrumentos metálicos):

Se trabajó con varios juegos de la misma herramienta para así mantener la asepsia:

- Estos instrumentos metálicos fueron colocados en un frasco que contenía alcohol al 95 %
- Se flameaba cada instrumento metálico en el mechero bunsen.

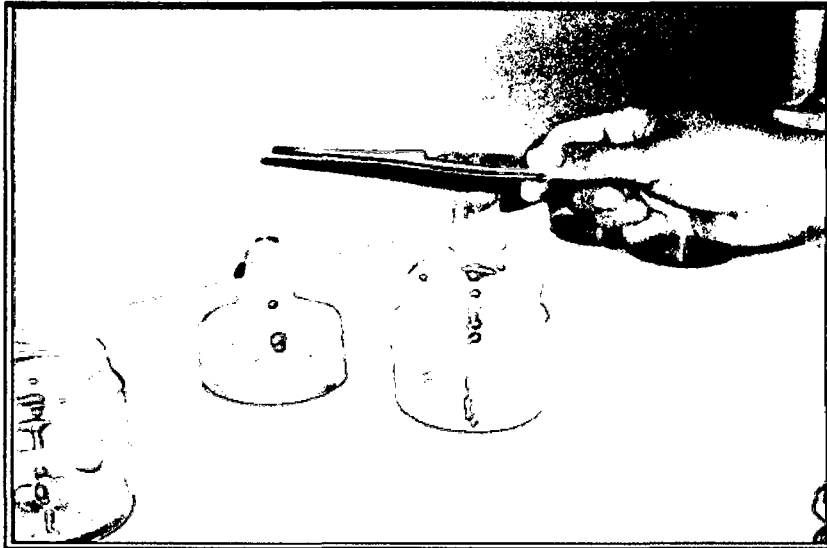


Foto 13. Esterilización del instrumento metálico.

- Luego los instrumentos esterilizados fueron colocados sobre una placa petri para así evitar el contacto con la mesa de trabajo y esperar que se enfríe para emplearlo.
- Este procedimiento se realizaba constantemente a los instrumentos metálicos que se utilizaban al momento de realizar cortes o siembras.

#### E) Operario:

Como método de desinfección para el caso del operario al momento de realizar siembras o manipulaciones de tejidos vegetales, fue que tanto las manos y eventualmente los antebrazos se tenían que pasar con alcohol al 95%. Además se usó mascarilla y mandil, para así reducir la contaminación a los medios de cultivos.

Se realizó las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible a la llama de un mechero, evitando exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en recipientes abiertos.



Foto 14. Siembra del explante.

#### **3.6.4 Preparación del medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ con la adición de citoquinina 6-BAP:**

La preparación del medio de cultivo se realizó en base a la constitución de sales de MS  $\frac{1}{2}$  (medio MS a la mitad de la concentración de nitratos), la cual se preparó de acuerdo a las proporciones indicadas en el cuadro N° 1, regulando el pH 5,7 (valor prefijado mediante la adición de NaOH y/o HCl 0.1-1 N); se preparó 1.2 litros del medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ , a este medio de cultivo se le añadió la citoquinina 6-BAP en las siguientes concentraciones 0; 1; 3 y 6 mg/L, las concentraciones de citoquinina 6-BAP se prepararon por separado, a razón de 300 ml por nivel. Seguidamente el medio de cultivo se distribuyó equitativamente en 120 tubos de ensayo (10 ml por tubo), y se colocaron dentro del autoclave a 121°C, a 33 Kg./cm<sup>2</sup>, por 15 min, finalmente se enfrió hasta que la solución se tornó en consistencia gelatinosa y lista para en el establecimiento de los segmentos nodales.

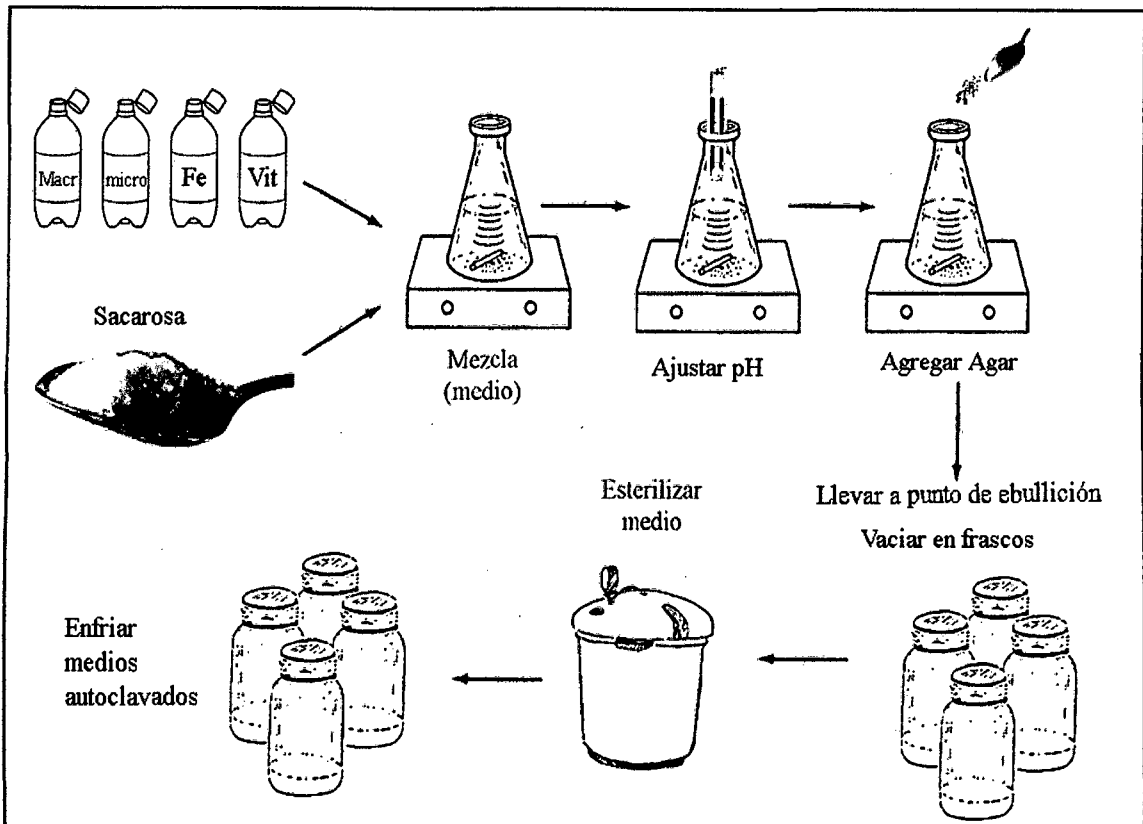


Figura 1: Descripción preparación del medio de cultivo.

Fuente: cit. por Ángela Blanco B. (DUOC UC-Escuela de Recursos Naturales Ingeniería (E) Agronomía Fisiología Hortícola.

### 3.6.5. Establecimiento de los segmentos nodales en el medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ con las diversas concentraciones de 6-BAP

Se colocaron los segmentos nodales previamente tratados con el protocolo de desinfección según Collado (2004), dentro de los tubos de ensayo (1 segmento nodal por tubo) que contuvieron el medio de cultivo con las diferentes concentraciones de 6-BAP (0; 1; 3 y 6 mg/L), esta operación se realizó en la cámara de flujo laminar del laboratorio. Previo al establecimiento se dejó encendida la cámara por 30 minutos antes de empezar el proceso de establecimiento, con el objeto de eliminar los posibles vectores de contaminación existentes dentro de la cámara.

Una vez transcurrido el tiempo de espera, se realizó la desinfección de las paredes de la cámara de flujo laminar con algodón y alcohol de 95°, de igual manera se desinfectó todos los materiales utilizados dentro de la cámara.

Cumplido el protocolo preliminar de asepsia, se inició el proceso de establecimiento de los segmentos, que se realizó utilizando para ello pinzas previamente esterilizadas en alcohol de 95°, con las cuales se colocaron los segmentos en los tubos de ensayo, obteniéndose al final del proceso 120 tubos de ensayo con un total de 120 segmentos nodales en los Medios de cultivo MS ½ con diversas concentraciones de 6-BAP, se hizo 4 tratamientos (concentraciones de 6-BAP) y 3 repeticiones con 10 segmentos nodales por cada repetición (figura 17). Este proceso terminó con el rotulado de los tubos, que contuvo la fecha, y el tipo de medio de cultivo MS½ con las concentraciones respectivas de 6-BAP (0;1; 3 y 6 mg/L).

### **3.7. Procedimiento experimental del tercer ensayo.**

#### **3.7.1. Descripción del experimento.**

El experimento se realizó en tres ensayos, en los dos primeros, que duraron un mes cada uno por la rápida contaminación de los explantes, se repitieron los mismos pasos del protocolo experimental, con la diferencia que en el segundo se tuvo más cuidado en la fase del protocolo de desinfección de los materiales recomendado por Collado (2004), para tratar de disminuir la contaminación por efecto de agentes patógenos, en este caso de hongos y bacterias, sin embargo se obtuvo el mismo resultado negativo del 100% de contaminación por los mencionados patógenos, siendo el número de contaminados por hongos mayor que el número de contaminados por bacterias.

A raíz de los resultados negativos en los dos ensayos anteriores, para el tercer ensayo, se realizó algunas modificaciones en cuanto a la desinfección, como disminuir el tiempo de exposición de los explantes en la solución de hipoclorito de sodio, de 30 minutos se redujo a 10 minutos, para disminuir el resecamiento o necrosis de los segmentos por efecto del desinfectante, basado en lo realizado por (Alvarado-Capó, 1998) que encontraron la existencia de la interacción entre la concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición de los explantes que se observa en los valores obtenidos por los tratamientos para cada una de las variables. El tratamiento NaClO al 1.5 % con un tiempo de exposición de los

explantes durante 10 minutos, alcanzó el valor máximo de supervivencia y un bajo porcentaje de contaminación.

Además se agregó al medio de cultivo con la hormona BAP una dosis de 1ml. del antibiótico tetraciclina 500 mg, y 1ml. del fungicida formate 600 mg. para tratar de contrarrestar la contaminación de los patógenos.

### Preparación del antibiótico y fungicida

- Se preparó 2 matraces de Erlenmeyer con 250 ml de agua destilada estéril cada uno, donde se añadió 500 mg de tetraciclina y 600 mg de formate respectivamente.
- Se sacaron los frascos que contenían el medio de cultivo donde se añadió a cada frasco 1 ml de tetraciclina y 1 ml de formate.

Esta modificación dio como resultado una disminución sustancial de contaminación, entre la semana 9 y la semana 14 del experimento, teniendo una sobrevivencia de 78 segmentos nodales libres de contaminación que representa el 65% del total de muestras, distribuido en los cuatro tratamientos de la hormona BAP, tal como lo muestra el siguiente cuadro.

Cuadro 2: segmentos no contaminados (fase con la hormona BAP)

	BAP (mg/lt)				Total segmentos no contaminados
	0	1	3	6	
Nº brotes (unid.)	0	0	0	0	
Nº segmentos no contaminados (unid.)	21	16	25	16	78

Fuente propia

Se esperaba que con el incremento de la sobrevivencia de los segmentos nodales en este periodo y estando libres de contaminación, alguna de la dosis de la hormona BAP diera como resultado los brotes esperados, sin embargo esto no ocurrió.



Seguidamente se trasladaron estos 78 segmentos nodales sobrevivientes de la primera fase, al medio de cultivo con la hormona AIB en los cuatro tratamientos, las cuales fueron evaluadas durante un periodo de 6 semanas más, tiempo en el cual se observó que ninguno de los tratamientos propició el enraizamiento esperado, además de la contaminación de 5 segmentos más y 7 segmentos muertos por resecamiento, dando como resultado enraizamiento nulo, pero logrando la sobrevivencia final de 66 segmentos nodales libres de contaminación, que representa el 55% de sobrevivencia de segmentos nodales, hasta el final del experimento, no significando esto sobrevivencia de plántulas con brotes y raíces, que fue lo que se esperaba.

En este momento no viendo enraizamiento se dio por culminado el tiempo de espera y se terminó el experimento no obteniendo los resultados previstos.

Cuadro 3: segmentos no contaminados (fase con la hormona AIB)

	AIB (mg/lt)				Total segmentos no contaminados
	0	1	3	6	
<b>Nº raíces (unid.)</b>	0	0	0	0	
<b>Nº segmentos no contaminados (unid.)</b>	18	15	20	13	66

Fuente: elaboración propia.

### 3.7.2. Descripción de los factores y tratamientos en estudio.

Factores y niveles en estudio.

1<sup>ra</sup> fase:

Sustrato (A):

- Medio de cultivo

Hormona BAP(B):

- B<sub>1</sub>: 0 mg/lt
- B<sub>2</sub>: 1 mg/lt
- B<sub>3</sub>: 3 mg/lt
- B<sub>4</sub>: 6 mg/lt

Cuadro 4: Descripción de los tratamientos empleados con la hormona BAP

Nº	TRATAMIENTO	CODIGO	DOSIS BAP (mg/lt)
1	T1	AB1	0
2	T2	AB2	1
3	T3	AB3	3
4	T4	AB4	6

2<sup>da</sup> fase:

Sustrato (A):

- Medio de cultivo

Hormona AIB (B):

- B<sub>1</sub>: 0 mg/lt
- B<sub>2</sub>: 1mg/lt
- B<sub>3</sub>: 3mg/lt
- B<sub>4</sub>: 6mg/lt

Cuadro 5: Descripción de los tratamientos empleados con la hormona AIB.

Nº	TRATAMIENT	CODIGO	DOSIS AIB (mg/lt)
1	T1	AB1	0
2	T2	AB2	1
3	T3	AB3	3
4	T4	AB4	6

### 3.7.3. Diseño experimental.

Para el experimento se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA), cuyos componentes fueron un sustrato (MS ½) y 2 hormonas de crecimiento (BAP y AIB), divididas en 4 concentraciones cada una (0,1,3, 6 mg/Lt.). Los promedios de cada tratamiento se hubieran sometido a una prueba de Duncan al 95% (Calzada, 1985), y la interpretación del efecto de los tratamientos mediante el análisis de varianza que se muestra en el cuadro N° 6 y 7, junto con la regresión lineal pertinente en cada caso (BAP y AIB), con la finalidad de determinar el mejor tratamiento y sus efectos en la propagación de segmentos nodales de quinilla.

El experimento se realizó en dos fases con respecto a las hormonas:

En la primera fase se utilizó la hormona BAP tomando para ello 30 muestras (segmentos nodales) por cada dosis de hormona (0,1,3,6 mg/Lt.) lo que significa que resultó en 4 tratamientos, con tres repeticiones, dando como resultado una población de 120 muestras (segmentos nodales) distribuidas de esta manera:

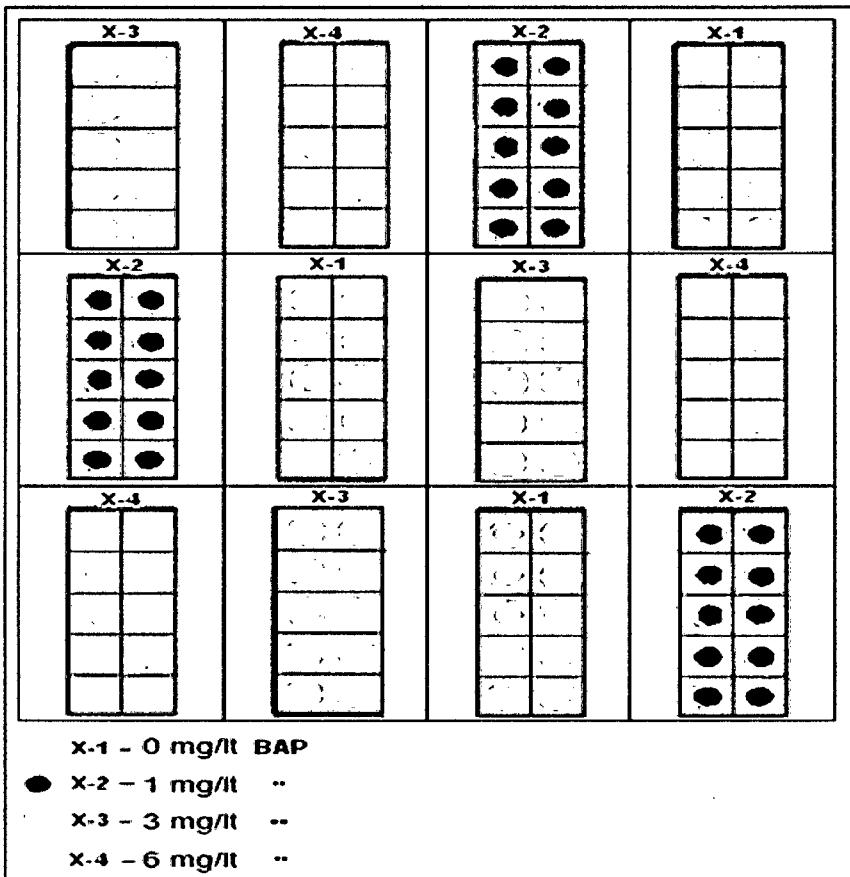


Figura 2: diagrama del diseño experimental en la fase con BAP.

En la segunda fase se pensó formar con las 80 mejores muestras, de la fase anterior, 16 grupos de tubos de ensayo con 5 tubos por grupo, de los cuales 20 serían para cada concentración con la auxina AIB (0; 1; 3 y 6 mg/l) de la siguiente manera:

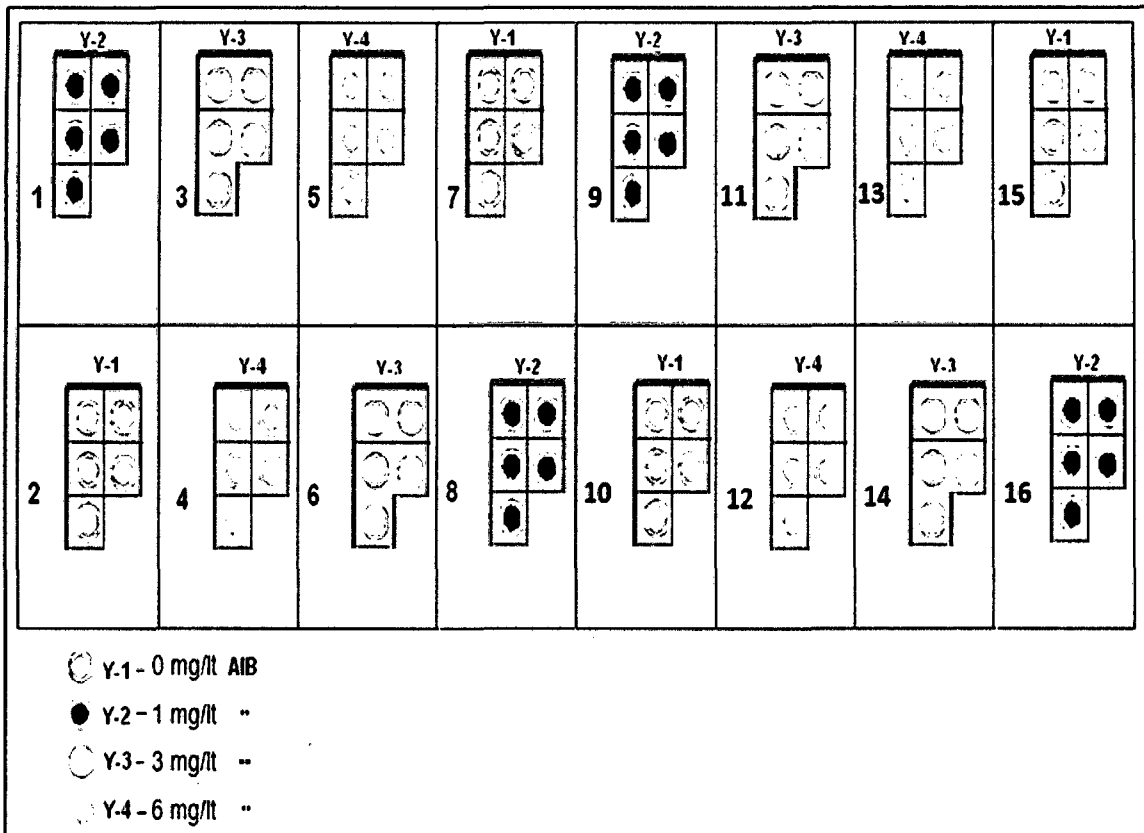


Figura 3: diagrama del diseño experimental en la fase con AIB con un total de 80 muestras.

### 3.8. Principales variables evaluadas.

#### 3.8.1 Variables independientes: Reguladores de crecimiento:

- Citoquinina – BAP
- Auxina – AIB

### **3.8.2 Variables dependientes:**

#### **A) Porcentaje de brotes (%) BAP**

Se tuvo en mente evaluar hasta el final del experimento, la formación de brotes en base al número de hojas nuevas formadas por cada segmento nodal, a partir del momento en que estas fueron colocadas en el medio de cultivo con las respectivas dosis de BAP, evaluación que no fue posible realizar puesto que no se llegó a producir la presencia de brotes en ninguno de los tratamientos realizados.

#### **B) Porcentaje de enraizamiento (%) AIB**

Se considerarían aquellas raíces iguales o mayores de 1cm. Las mismas que hubieran sido medidas con una regla, sin embargo esto no fue posible, debido a que, en ninguno de los tratamientos con las dosis de AIB se apreció presencia de raíces hasta la conclusión del experimento.

#### **C) Porcentaje de sobrevivencia (%)**

Del mismo modo el número total de plántulas sobrevivientes por cada tratamiento al final del experimento fue cero o nulo, puesto que se consideraría como plántulas, solo aquellos segmentos nodales que hayan desarrollado satisfactoriamente raíces y brotes.

### 3.8.3 Esquema de análisis de varianza (ANVA)

- Con las concentraciones de BAP:

Cuadro 6: esquema de ANVA para la fase BAP

Fuente de Variabilidad	Grados de libertad
Entre concentraciones de BAP	$(P - 1) = 3$
Error	$(P \times q)(n - 1) = 32$
Total	$(P \times q \times n - 1) = 47$

Donde: n = N° de repeticiones. (Considerando 3 repeticiones)

p = Variantes del primer factor.

q = Variantes del segundo factor.

- Con las concentraciones de AIB:

Cuadro 7: esquema de ANVA para la fase AIB

Fuente de Variabilidad	Grados de libertad
Entre concentraciones de AIB	$(P - 1) = 3$
Error	$(P \times q)(n - 1) = 48$
Total	$(P \times q \times n - 1) = 63$

Donde: n = N° de repeticiones. (Considerando 4 repeticiones)

p = Variantes del primer factor.

q = Variantes del segundo factor.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1. Periodo del experimento:

El experimento se realizó en tres ensayos que tuvo una duración de veinte (20) semanas en total y se dividió de la siguiente manera:

Cuadro 8: Duración y porcentaje de sobrevivencia de explantes.

Número de ensayo	Tiempo utilizado(Semanas)	Hormona utilizada	Número de explantes sobrevivientes	Sobrevivencia de explantes (%)
Primer	1- 4	BAP	0	0
Segundo	5- 8	BAP	0	0
Tercer	9-14	BAP	78	65
	15-20	AIB	66	55

Número total de explantes utilizado en el tercer ensayo fue 120.

Para determinar el porcentaje final se utilizó la regla de tres simples

Asi: 120 explantes ----- 100%

66 explantes ----- X ?

X= 55 %

El tercer ensayo, se dio como consecuencia de los resultados negativos, es decir, contaminación total de los explantes por hongos, bacterias y resecamiento en los dos primeros ensayos.

Debido a ello, los resultados del presente trabajo se basan principalmente en lo que ocurrió en el tercer ensayo; observando lo siguiente:

#### 4.2 Influencia de la dosis de BAP en la formación de brotes (tercer ensayo):

De acuerdo al procedimiento realizado hasta el final de la semana catorce (14), no se observó influencia positiva de la hormona BAP para formar brotes en los segmentos nodales de quinilla colorada (número de brotes = cero (0)) tal como se observa en el cuadro 2; puesto que, ninguna de las dosis de la mencionada hormona generó los brotes, resultado que contrasta del encontrado por Collado

(2004), en un experimento con caoba, quien al utilizar 0,2 mg./lt. BAP obtuvo 63.9% de explantes brotados y 1,5 cm de longitud de brotes.

#### **4.3. Influencia de la dosis de AIB en el Porcentaje de enraizamiento (%).** **(Tercer ensayo):**

Al finalizar el experimento en la semana veinte (20), no se observó la influencia positiva de la hormona AIB en el enraizamiento de los segmentos nodales de quinilla, (número de raíces = cero (0)) como se muestra en el cuadro N° 3, resultado que difiere con (Taiz y Zeiger, 1998; Vásquez *et al.*, 2006) que sostienen que el AIB presenta una eficiencia del 29 % en los medios de cultivo promoviendo las raíces en plantas leñosas.

#### **4.4. Influencia del método de desinfección en la sobrevivencia de explantes (%)**

Modificar el método de desinfección, como disminuir el tiempo de exposición de los explantes en la solución de hipoclorito de sodio, de 30 minutos a 10 minutos (Alvarado-Capó, 1998), para disminuir el resecamiento o necrosis de los segmentos por efecto del desinfectante, y agregar al medio de cultivo una dosis de 1ml. del antibiótico tetraciclina 500 mg, y 1ml. del fungicida formate 600 mg., redujo sustancialmente la muerte por necrosis y la contaminación de los explantes por agentes patógenos (hongos y bacterias).

#### **4.5. Porcentaje de sobrevivencia (%)**

Al final de la semana veinte (20), no se obtuvo la formación de ninguna plántula con brotes y raíz, por lo tanto, no hubo **sobrevivencia de plántulas**, no obstante, cabe resaltar que si bien es cierto no hubo plántulas, si se consiguió algo muy importante y positivo, que fue la sobrevivencia de 66 segmentos nodales que representa el 55% de la población total de muestras libres de contaminación por hongos y bacterias al final del experimento, lo que indica que el protocolo de desinfección y la dosis del antibiótico administrado al medio de cultivo realizado en el tercer ensayo fue sustancialmente efectivo.



#### **4.6. Análisis de Varianza.**

Cabe indicar que debido al resultado obtenido del experimento en sus respectivas fases (número de brotes con la hormona BAP y enraizamiento con la hormona AIB), numéricamente resultó cero (0), siendo así, no fue necesario realizar el análisis de varianza para ninguna de las variables antes mencionadas, puesto que evidentemente no se encontraría diferencia significativa entre los tratamientos por ser el resultado cero para todas las variables.

## CAPITULO V.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- Se estableció que ninguna de las dosis de la hormona BAP, favoreció el efecto positivo en la formación de brotes en los segmentos nodales de quinilla colorada.
- De igual modo en este caso, ninguna de las dosis de la hormona AIB, resultó benéfico para la formación de raíces en los segmentos nodales de quinilla colorada.
- Debido al número final de sobrevivencia de segmentos nodales que fue 66 sin formar brotes y raíces, se desprende que la modificación en el método de desinfección y el efecto de la dosis (1ml/muestra) del antibiótico tetraciclina administrado al medio de cultivo, resultó favorable para disminuir la contaminación de las muestras por agentes patógenos (hongos y bacterias), sin embargo, la cantidad alta de dosis hormonal suministrada parece haber inhibido de alguna manera su efecto en la formación de brotes y raíces.
- De lo observado en el presente trabajo, en comparación con otras investigaciones realizadas en propagación *in vitro*, parece resultar que cada especie tiene sus propios requerimientos; como métodos de desinfección, periodo del año en el que se recolectan las muestras, dosificaciones hormonales, entre otros, puesto que los factores que resulten exitosos en una especie, no quiere decir que necesariamente resultarán del mismo modo en todas las demás especies.

## 5.2. RECOMENDACIONES:

Siendo el factor limitante para este experimento, el desconocimiento de la dosificación hormonal exacta tanto para BAP como para AIB y no habiendo encontrado resultados esperados con la dosificación empleada, se sugiere:

- Experimentar con otras dosis hormonales menores.
- Usar el método de desinfección empleado en el tercer ensayo, porque resultó benéfico para reducir la muerte por resecamiento y la contaminación por agentes patógenos en esta especie.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, S 1959. Propagación vegetativa de leñosas y forestales. Editorial La hacienda. Barcelona España. 36p.
- Alvarado-Capó, (1998) Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. En: Pérez, JN (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 81-104. IBP. Santa Clara.
- Álvarez, 2006. Aspectos generales del cultivo "in vitro" en plantas. México. En línea: <http://fbio.uh.cu/webfv/docencia/mediocultivos.ppt>
- Azcon, J. (1993). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Madrid: McGraw Hill. 84-486-0033-9. En línea: <http://es.wikipedia.org/wiki/Citoquinina>
- Barcelo, C. 2001. Fisiología Vegetal. Editorial Anaya S.A.C. Madrid – España. Pág. 298
- Baggio, A. 1982. Establecimiento, manejo y utilización del sistema agroforestal cercos vivos de *Gliricidia sepium* en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba.C.R. UCR/CATIE. 91p.
- Braco, L y Zarucchi, J. L. 1993. Catálogo de *Angiospermas* y *Gimnospermas* del Perú. 448p.
- Calzada, J. 1980. 143 frutales nativos, universidad agraria nacional La Molina. Lima-Perú. 313 p.
- Closas et al. 1999. Cultivo In Vitro. Universidad de Lleida-España. En línea: <http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>.
- Collado, R (2004) Establecimiento in vitro de ápices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla King*. Biotecnología Vegetal 4 (3): 143-146.

- Cabello, A. 2000. Propagación Asexual. Apuntes de Clases N° 2. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales: Universidad de Chile. 10 p.
- Calzada, J. 1985. Métodos estadísticos para la investigación. 3ra Ed. Editorial Jurídica S.A. Lima. 644 p.
- Dieter H. 1980. Fisiología Vegetal. Ediciones Omega. Barcelona España. Pág. 240
- Erston V. 1967. Fisiología Vegetal. Editorial Hispano Americano. Mexico. Pág. 240
- Díaz E.R.A, Salazar R, Mesén F. 1991: Enraizamiento de estacas juveniles de *Gmelina arborea* Linn. Silvoenergía, 49.1- 4 p.
- Daquinta, *et al.* 2003. Manejo Biotecnológico de Especies Forestales y Bambués en Cuba. XII Congreso Forestal Mundial. Québec-Canadá. En línea: <http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/WFC/XII/0121-B4.HTM>
- Easley, D. F. 1989. Tendencia en el potencial de enraizamiento de *Eucalyptus grandis*. Cartón de Colombia. Informe de Investigación nº 126. 5 p.
- Flores y follajes del caribe s.a. (ffc). 2008. la Micropropagación. Costa Rica. En línea: <http://www.agrobiot.com/faq.php>
- Gamborg, OL.; et al. 1968. Nutrient requirements of suspensión cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- Hartmann, H y Kester, D. 1996. Propagación de plantas. 5ta edición. México. Compañía Editorial Continental S. A. de C. V. México 760 p.
- Hartmann, H. Kester, D. 1983. Propagación de plantas, principios y prácticas. México D.F. 814 p.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas-Cuba. Artículo Científico Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 1: 45 - 51, enero - marzo, 2007.

Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), 1998. Estudio de propagación vegetativa tres especies. Programa Nacional de Investigación de agroforestería y cultivos tropicales. Experimento cod 98. 52. 05.

Kains, M. y Mcquesten, L. 1938. Propagation of plants. New York. USA. Orange Judo Publishing Company, INC. 639 p.

Lloyd, G.; McCown, B. 1980 Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society. 30:421-427.

Lucas C. 2002. Principio de Propagación de Plantas. Artículo Científico. Chosica-Perú. En Línea: <http://www.cannabiscfe.net/foros/showthread.php?t=14307>

Mesen F, Newton AC, Leakey RRB. 1997. The effects of propagation environment and foliar areas on the rooting physiology of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken cuttings. Trees. 11:401-411.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:53-58.

Pelacho, A. et al. 2006. Unidad de Fisiología Vegetal del Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida-España. En línea: [www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm](http://www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm)

Pérez, J. et al. 1999. Aclimatación (Fase IV). Características y problemáticas. En: Biotecnología Vegetal, Libro de Reportes Cortos. 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. (Ed.) Pérez Ponce, J. N. Instituto de Biotecnología de las Plantas Santa Clara. Cuba. p. 188 - 189.

Quijada R.M 1980. Métodos de propagación vegetativa. En mejora genética de árboles forestales. FAO. DANIDA. Roma.341 pg.

Richter, H.G., and Dallwitz, M.J. 2000 onwards. Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In English, French, German, Portuguese, and Spanish. Version: 25th June 2009. <http://delta-intkey.co>

Reynel, C. et al. 2003. "Árboles útiles de la Amazonía Peruana, un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies". Perú. En línea: <http://wwfperu.org.pe/documentos/especies/Ficha%20Caoba.pdf>

Ruiz, G., Vargas, J., Cetina, V., Villegas, A. 2005. Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y tipo de estaca en el enraizado de *Gmelina Arbórea* Roxb. Revista Fitotecnia Mexicana. 28(4):319-326.

Ruiz, S. 2009. Efecto de cuatro dosis de ácido indolbutírico y tres tipos de estacas en el enraizamiento de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en san Martín. Tesis para optar el título de ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Selva. 30- 75pg.

Santisteban, C.S. 1986. Influencia de dos hormonas en el enraizamiento de estacas de aliso (*Alnus jorullensis*), en Cajamarca. Tesis para optar el título de ing. Agrónomo. Cajamarca – Perú. 982 p.

Sevilla, Holle. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. Primera edición. Edit. Torre Azul SAC. Lima, Perú. 445 p.

Strasburger, E. 1994. Tratado de botánica. Omega, Barcelona. 1.068 p.

Seiler, J. 2002. Forest Biology and Dendrology. Growth Regulators. (On line)  
Department of Forestry. Virginia Polytechnic Institute and State University.  
<http://www.fw.vt.edu>

Sica, 1998. La Micropropagación como Herramienta para la Producción Vegetal.  
En línea: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/>

Trucios, R. T. 1988. Calendario fonológico para 55 especies forestales del bosque nacional A. Von Humboldt. Pucallpa – Peru. Centro forestal (CENFOR) XII - Pucallpa. Serie: nota técnica N° 2. 26 p.

Taiz, L. 1998. Plant Physiology. 2ª ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., pp 458 – 461.

Vásquez *et al.* 2006. Propagación por estacas juveniles del balsa blanco (*Heliocarpus americanus* L.) utilizando propagadores de sub-irrigación. Rev. Fac. Nal. Agr. 59 (2): 3479-3498. en línea: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/776/77610104.pdf>

Weaver, R. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México D.F., México. Trillas. 622 p.

Yorleny, B. Y Olman M. (2005). Soluciones tecnológicas en el establecimiento de jardines clonales. Kuru: revista forestal. San José – Costa Rica. 2-4 p



ANEXOS



Foto 15: desinfección de la cámara de siembra



Foto 16: frascos rotulados y listos para evaluar



Foto 17: frascos en la cámara de incubación



Foto 18: evaluación de los explantes

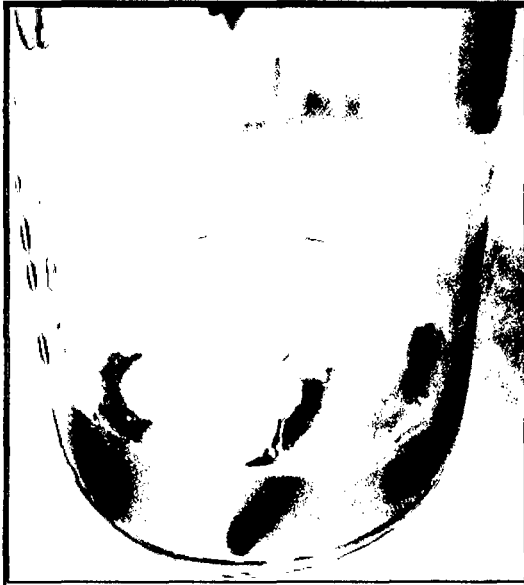


Foto 19: explantes resecados y contaminados



Foto 20: explantes contaminados con bacterias



Foto 21: resiembra de los explantes no contaminados

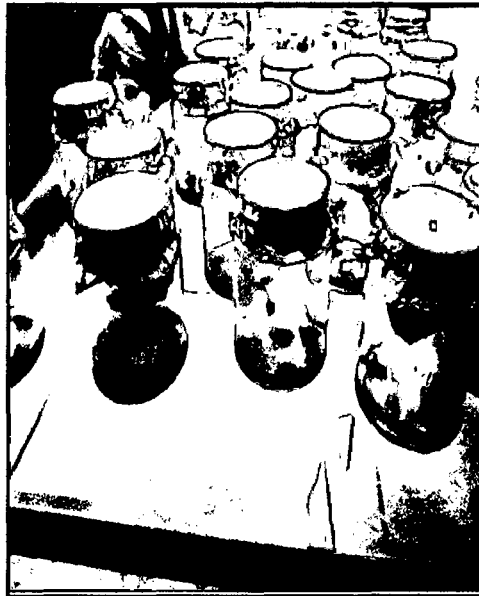


Foto 22: evaluación de los explantes con el antibiótico

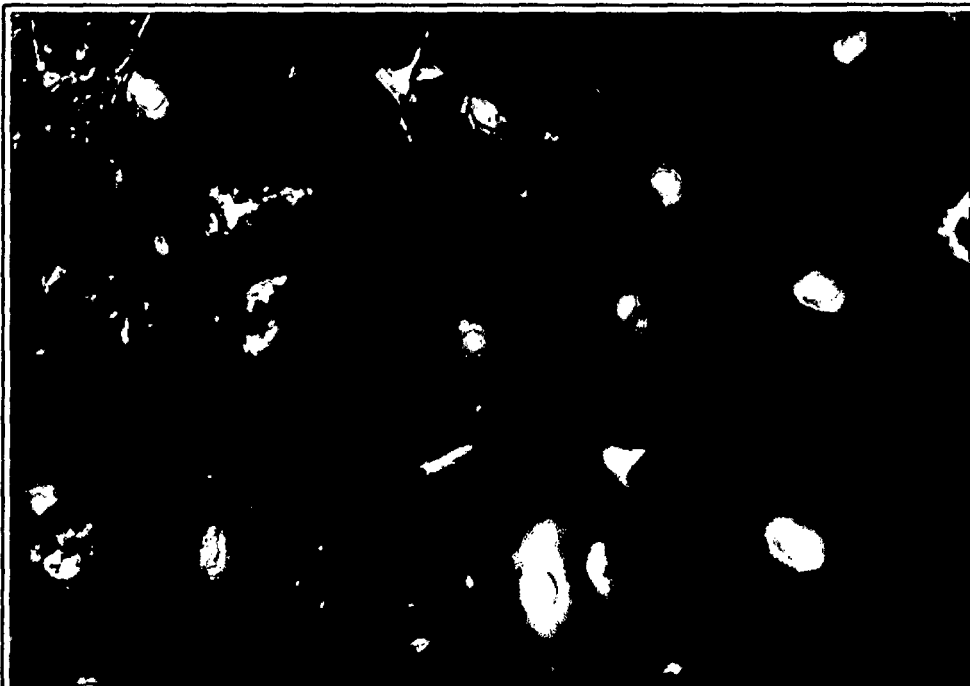


Foto 23: frutos maduros de quinilla colorada

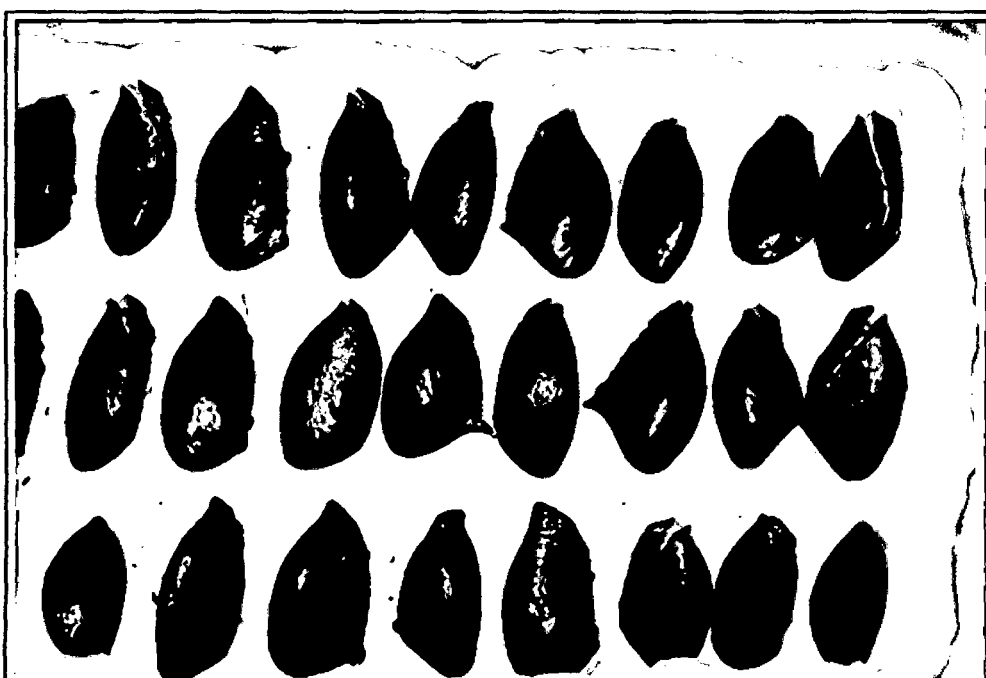


Foto 24: semillas de quinilla colorada

